

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-179355

(43)Date of publication of application : 18.07.1995

(51)Int.Cl.

A61K 38/00  
A61K 39/00  
// C07K 14/79

(21)Application number : 05-322089

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(22)Date of filing : 21.12.1993

(72)Inventor : SHIMAMURA SEIICHI  
FUKUWATARI YASUO  
KAINO AKIRA  
MIYAUCHI HIROFUMI

## (54) IMMUNOPOTENTIATOR FOR PROMOTING ANTIBODY PRODUCTION OF IGG AND IGM CLASS

### (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an immunopotensiator having extremely high safety capable of preventing and improving reduction in immunocompetence caused by disease, aging, etc., by promoting proliferation of lymphocyte and enhancing antibody production of IgG and IgM classes.

CONSTITUTION: This immunopotentiator for promoting antibody production of IgG and IgM class comprises a hydrolyzate obtained by hydrolyzing a lactoferrin selected from the group consisting of a mammalian lactoferrin, a mammalian apolactoferrin, a mammalian lactoferrin saturated with a metal and their arbitrary mixtures.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

28.12.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3207647

[Date of registration]

06.07.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-179355

(43)公開日 平成7年(1995)7月18日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ABD			
39/00	H	8318-4H		
// C 0 7 K 14/79			A 6 1 K 37/ 18	ABD
審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 5 頁)				

(21)出願番号 特願平5-322089

(22)出願日 平成5年(1993)12月21日

(71)出願人 000006127  
森永乳業株式会社  
東京都港区芝5丁目33番1号  
(72)発明者 島村 誠一  
神奈川県横浜市港北区篠原町1558  
(72)発明者 福渡 康夫  
神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘3-1-4-103  
(72)発明者 甲斐野 章  
神奈川県海老名市東柏ヶ谷1-11-16 M  
ハウス103  
(74)代理人 弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I g GおよびI g Mクラスの抗体産生を促進する

免疫賦活剤

(57)【要約】

【構成】 哺乳類のラクトフェリン、哺乳類のアポラクトフェリン、哺乳類の金属飽和ラクトフェリン、およびこれらの任意の混合物からなる群より選択されたラクトフェリンを加水分解して得られるラクトフェリン分解物を有効成分として含有する。

【効果】 リンパ球の増殖を促進し、I g GおよびI g Mクラスの抗体の産生を増強することにより、疾病、老化等による免疫能の低下を予防または改善することができ、乳等の天然物より調製したL F分解物を有効成分としているので、極めて安全性が高い。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 哺乳類のラクトフェリン、哺乳類のアポラクトフェリン、哺乳類の金属飽和ラクトフェリン、およびこれらの任意の混合物からなる群より選択されたラクトフェリンを加水分解して得られるラクトフェリン分解物を有効成分とする IgG および IgM クラスの抗体産生を促進する免疫賦活剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、IgG および IgM クラスの抗体産生を促進する免疫賦活剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、疾病、老化等による免疫能の低下を予防または改善する作用を有し、かつ安全性の高い免疫賦活剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 ラクトフェリンは、生体内では、涙、唾液、末梢血、乳汁等に含まれている鉄結合性タンパク質であり、大腸菌、ブドウ球菌および腸球菌に対して、0.5~30mg/ml の濃度で抗菌作用を有することが知られている [ジャーナル・オブ・デュー・サイエンス (Journal of Dairy Science)、第 67 巻、第 606 ページ、1984 年]。また、ラクトフェリンは熱に不安定であり、62.5℃ で 30 分の加熱によりその生理作用をほぼ失活し、70℃ で 15 分の加熱により完全に失活することが知られている [ジャーナル・オブ・ペディアトリックス (Journal of Pediatrics)、第 90 巻、第 29 ページ、1977 年]。

【0003】 従って、従来ラクトフェリン含有液を処理する場合であって、その工程中に加熱処理を包含する場合には、ラクトフェリンが失活するおそれがあり、十分な加熱処理を採用できないのが実情であった。さらに、ラクトフェリンそのものには抗菌作用ばかりではなく、無血清培地で培養したリンパ系細胞に対してその細胞の増殖促進作用 [バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et Biophysica Acta)、第 763 巻、第 377 ページ、1983 年] および抗体の産生促進作用 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)、第 54 巻、第 1087 ページ、1990 年] の存在が知られており、無血清培地における抗体産生促進に関する技術も開示されている (特開平 2-257892 公報)。

【0004】 この発明の発明者らは、ラクトフェリンそのものではなく、ラクトフェリン類の加水分解物から分離され、25 アミノ酸残基からなる特定のペプチドに好中球からのロイコトリエン B<sub>4</sub> の放出促進作用及び肥満細胞からのヒスタミン放出促進作用のあることを発見して特許出願し (PCT/J92/00275)、ラクトフェリン加水分解物および/またはそれから分離した特定のペプチドとビフィズス菌との併用により IgA 抗

体産生促進作用のあることを発見して特許出願し (特願平 4-188193 号)、さらにラクトフェリン、ラクトフェリン加水分解物またはこれらの混合物と上皮細胞成長因子との併用による消化管細胞賦活作用のあることも発見して特許出願した (特願平 4-202724 号)。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、従来ラクトフェリン類の加水分解物が血清の存在下で抗体産生促進作用を有するという報告はなされておらず、さらに、血清の存在下で IgG および IgM の両クラスの抗体産生を同時に促進するという報告は皆無であった。この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、全身性免疫に関係する IgG および IgM の両クラスの抗体産生能を血清存在下で同時に促進する新しい免疫賦活剤を提供することを目的としている。

## 【0006】

【問題を解決するための手段】 この発明の発明者らは、ラクトフェリン類の加水分解物の新規な作用効果について鋭意研究を重ねた結果、ラクトフェリン類の加水分解物が、血清存在下においても強い免疫賦活作用を発現し、IgG および IgM の両クラスの抗体産生を同時に促進することを発見し、この発明を完成した。

【0007】 すなわち、この発明は、上記の課題を解決するものとして、哺乳類のラクトフェリン、哺乳類のアポラクトフェリン、哺乳類の金属飽和ラクトフェリン、およびこれらの任意の混合物からなる群より選択されたラクトフェリンを加水分解して得られるラクトフェリン分解物を有効成分とする免疫賦活剤を提供する。次にこの発明について詳しく説明する。

【0008】 この発明において、出発物質として使用するラクトフェリンは、市販のラクトフェリン、哺乳類 (例えば人、牛、羊、山羊、馬等) の初乳、移行乳、常乳、末期乳等、またはこれらの乳の処理物である脱脂乳、ホエー等 (以下これらをまとめて乳等と記載する) から常法 (例えば、イオン交換クロマトグラフィー) により分離したラクトフェリン、それらを塩酸、クエン酸等により脱鉄したアポラクトフェリン、それらを鉄、銅、亜鉛、マンガン等の金属でキレートさせた金属飽和ラクトフェリン、あるいはそれらの混合物であって良い (以下これらをまとめて LF と記載する)。

【0009】 この発明に使用するラクトフェリン加水分解物は、前記 LF を酸または酵素で加水分解することによって得られる。酸による加水分解は、LF を 0.1~20% (重量。以下、特に断りのない限り同じ)、望ましくは 5~15% の濃度で水または精製水等に溶解し、得られた溶液に塩酸、リン酸等の無機酸、またはクエン酸等の有機酸を添加し、溶液の pH を 1~4、望ましくは 2~3 に調整する。得られた溶液は、調整された pH に応じて、適当な温度で所定時間加熱して加水分解す

る。例えば、pHが1~2に調整された場合には80~130℃、望ましくは90~120℃で、pH2~4に調整された場合には100~130℃、望ましくは100~120℃で、それぞれ1~120分間、望ましくは5~60分間加熱する。

【0010】酵素により加水分解する場合には、LFを0.5~20%、望ましくは5~15%の濃度で水、精製水等に溶解し、得られた溶液を使用される酵素の至適pHに調整して加水分解する。使用する酵素には特に制限がなく、市販の酵素、例えばモルシンF（商標。盛進製薬社製。至適pH2.5~3.0）、豚ペプシン（和光純薬社製。至適pH2~3）スミチームAP（商標。新日本化学社製。至適pH3.0）、アマノM（商標。アマノ製薬社製。至適pH3.0）、アマノA（商標。アマノ製薬社製。至適pH7.0）、トリプシン（ノボ社製。至適pH8.0）等を単用または併用するが、特に、豚ペプシンを単用または他の任意の酵素との併用するのが望ましい。使用する酵素の量は、基質に対して0.1~5.0%の範囲、特に、0.5~3.0%が望ましい。

【0011】すなわち、この酵素による加水分解は、具体的には、ラクトフェリン類の溶液のpHを調整し、上記の酵素を適量添加した後、得られた溶液の温度を15~55℃、望ましくは30~50℃で30~600分間、望ましくは60~300分間保持してラクトフェリン類を加水分解する。次いで溶液をそのまま、または中和した後、酵素を常法により加熱失活する。

【0012】これらの酸または酵素を用いる方法によって得られた反応液を、常法により冷却し、必要に応じて中和、脱塩、脱色し、得られた溶液をそのまま、濃縮して液状の濃縮製品、または濃縮後乾燥して粉末製品とすることができる。前記の加水分解の条件は、厳密なものではなく、製造コスト、例えば、温度、時間、酸または酵素の種類および量、反応装置（加圧の有無）等を考慮して適宜条件を設定できる。

【0013】以上の方法によって得られたLF分解物は、種々の分子量を有する分解物の混合物であり、LF分解物の分解率は、タンパク質の抗原性消失の観点から、ホルモール滴定による分解度が6~20%、特に7~15%の範囲が望ましい。こうして得られたLF分解物は、血清存在下において1gGおよび1gMクラスの抗体産生を促進する免疫賦活活性を有する。

【0014】LF分解物の免疫賦活活性は、リンパ系細胞を活性化し、主として1gGおよび1gMクラスの抗体産生を促進することにより全身性免疫を賦活化する。従って、この発明によるラクトフェリン分解物は、そのまま、あるいは賦形剤または他の薬剤と混合して1gGおよび1gMクラスの抗体産生を促進する免疫賦活剤として用いることができる。

【0015】この発明の免疫賦活剤の投与量または摂取

量は、対象者の年齢、体重、症状等により異なるが、成人1日当たりLF分解物として少なくとも0.1mg/kg体重が望ましい。ラクトフェリン類、およびその加水分解物は、天然物であるから、それらの安全性について問題がないことは明らかである。

【0016】次に、試験例を示してこの発明の作用効果を詳しく説明する。

#### 試験例1

この試験は、マウス脾臓リンパ細胞のDNA合成促進作用に及ぼすLF分解物の作用について調べるために行った。

#### 1. 試料の調製

##### 1) LF分解物の調製

乳等から分離したままの市販のLF〔ベルギーのオレオフィナ社製。ここで「乳等から分離したままの」なる表現は、ラクトフェリンの分離を行ったのみであって、脱鉄、金属飽和等の化学処理を行っていないことを意味する（以下同じ）〕を5%の濃度で精製水に溶解し、1Mの塩酸を添加し、pHを2~3に調整し、豚ペプシン（和光純薬社製）を基質に対して3%の割合で添加して均一に混和した。次いで、この溶液を37℃で8時間保持し、のち80℃で15分間保持して酵素を失活させ、水酸化ナトリウム溶液で反応溶液を中和し、遠心（1000rpmで10分間）して不溶解物を除去し、上清を凍結乾燥し、試験試料を得た。2) マウス脾臓リンパ細胞（以下リンパ細胞と記載する）の調製

SPFマウス（BALB/c系、雌、6週齢）を屠殺し、脱血し、のち脾臓を無菌的に摘出し、常法（財団法人日本生化学会編、『新生化学実験講座12 分子免疫学I』、第1版、第9ページ、東京化学同人発行、1989年）により個々のリンパ細胞を採取し、次の測定用培地によりリンパ細胞を3回洗浄し、リンパ細胞数を $4 \times 10^6$ 個/mlに調整した。

##### 3) 測定用培地の調製

10%のFBS、15mMのHEPESを添加したRPMI1640（大日本製薬社製）培地を調製した。

#### 2. 実験方法

96穴マルチプレート（ヌンク社製）に、1穴当たり $2 \times 10^6$ 個の前記リンパ細胞および表1に示す濃度でLF分解物を添加し（試験試料）、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で42時間培養した。その後、9.25kBq/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジン（ICNバイオメディカルズ社製）を加え、さらに6時間、同一環境下で培養した。培養終了後、常法により各穴の細胞を回収し、シンチレーションカウンター（LKB社製）を用いてリンパ細胞に取り込まれた<sup>3</sup>H-チミジンのカウントを測定した。なお、試験物質を添加しない対照試料についても同様に試験した。

【0017】得られた1分間当たりのカウント値を次式により標準化し、その値（SI：刺激指標）を表示し

た。

$SI = (\text{試験試料のカウント : cpm}) / (\text{対照試料のカウント : cpm})$

### 3. 試験結果

この試験の結果は表1に示すとおりである。表1に示す3回の反復試験の結果から明らかなように、LF分解物を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で添加した試料では、リンパ細胞のDNA合成を促進することが認められ、LF分解物の添加量の増加によりリンパ細胞のDNA合成が顕著に促進された。血液を含む培地でリンパ細胞のDNA合成が促進されたことは、血液を含まない培地よりも生\*

\* 体に近い状態で、LF分解物がリンパ細胞の増殖を促進することを示しており、リンパ細胞の増殖は、IgGおよびIgMクラスの抗体産生を促進することが推定される。この推定は、次の試験例2により実証された。

【0018】なお、試験例1の結果を検証するために、リンパ細胞の増殖を促進することが公知である市販のLPSおよびConAを用いて同時に試験を行ったが、この試験に誤りのないことが確認された。

【0019】

【表1】

添 加 物	添加濃度	試 験 回 数		
	( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1	2	3
対 照 (無添加) L F 分 解 物		1.00	1.00	1.00
	1	1.07	1.03	1.13
	10	1.18	1.28	1.25
	100	2.53	2.78	2.70
	1000	5.45	7.52	6.75

(注) 表中の数値はSIで示した。

### 【0020】試験例2

この試験は、LF分解物のIgGおよびIgMクラスの抗体産生促進効果を調べるために行った。

#### 1. 試料の調製

試験例1と同一の方法によりLF分解物を調製した。

#### 2. 試験方法

リンパ細胞を試験例1と同一の方法により調製し、 $10^6$ 個/ $\text{ml}$ の割合に調整したリンパ細胞を、チューブ当たり $1 \text{ ml}$ ずつ分注し、表2に示す濃度でLF分解物を添加し、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で1週間培養した。培養終了後、培養上清中のIgGおよびIgMクラスの抗体量を酵素抗体法 [イムノケミストリー (Immunochemistry)、第8巻、第871ページ、1971年] により測定し、培養上清中にリンパ細胞から産生されたIgG※

20※およびIgMの量を測定した。なお、LF分解物を添加しない対照試料についても、前記と同一の方法によりIgGおよびIgMの量を測定した。

### 3. 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなようにLF分解物を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で添加した試験試料において、IgGおよびIgMクラスの抗体産生が格段に促進されることが認められ、LF分解物の添加量の増加によりこれらの抗体産生が顕著に促進された。この試験結果は、従来全く知られていなかったLF分解物の新しい効果を示しており、この発明の発明者らが初めて見出した事実である。

【0021】

【表2】

添 加 物	添加濃度	抗 体 産 生	
	( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	IgM ( $\text{ng}/\text{ml}$ )	IgG ( $\text{ng}/\text{ml}$ )
対 照 (無添加) L F 分 解 物		163.2 ± 38.2	385.4 ± 165.2
	10	169.5 ± 21.7	397.4 ± 111.0
	100	431.0 ± 109.6	1816.1 ± 646.0
	1000	893.6 ± 283.9	2279.7 ± 2237.4

### 【0022】試験例3

この試験は、リンパ細胞のDNA合成促進作用に及ぼす血清濃度について調べるために行った。

#### 1. 試料の調製および試験方法

培地中の血清濃度およびLF分解物の添加量を表3に示すとおり変更したことを除き、試験例1と同一の方法により試験を行った。

### 2. 試験結果

この試験の結果は、表3に示すとおりである。表3から明らかなように、培地に添加する血清濃度およびLF分解物の添加量の増加にともない、リンパ細胞のDNA合成が、相乗的に促進されることが認められた。

【0023】

【表3】

添 加 物	添加濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	取 り 込 み 量 (mg)			
		濃 度 (%)			
		2.5	5.0	1.5	10
対照 (無添加) L F分解物		2462 $\pm$ 198	2401 $\pm$ 89	2753 $\pm$ 460	2623 $\pm$ 299
	1	2393 $\pm$ 109	2432 $\pm$ 45	2450 $\pm$ 233	2497 $\pm$ 223
	25	2391 $\pm$ 125	2870 $\pm$ 304	3454 $\pm$ 129	3311 $\pm$ 213
	100	4302 $\pm$ 39	5139 $\pm$ 319	5729 $\pm$ 154	6304 $\pm$ 211
	1000	5182 $\pm$ 433	6951 $\pm$ 346	11251 $\pm$ 948	12568 $\pm$ 861

【0024】次に実施例を示してこの発明をさらに詳細 \* 【0025】  
かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定さ 10 【実施例】  
れるものではない。

試験例1  
結晶セルロース 50.0 (mg)  
コーンスターチ 170.0  
タルク 66.0  
ステアリン酸マグネシウム 11.0  
3.0

1錠当たり上記の割合の各原料を常法により均一に混合 ※いた。  
し、造粒し、乾燥し、打錠し、錠剤を得た。なお、ラク 実施例2  
トフェリン加水分解物以外の原料はいずれも市販品を用※

試験例1と同一の方法によるラクトフェリン加水分解物 50.0 (g)  
結晶セルロース 375.0  
コーンスターチ 575.0

上記各材料を均一に混合し、1gずつ常法により包装 ★加水分解物以外の原料はいずれも市販品を用いた  
し、散剤1000袋を調製した。なお、ラクトフェリン★ 実施例3

試験例1と同一の方法によるラクトフェリン加水分解物 20.0 (g)  
結晶セルロース 78.0  
コーンスターチ 20.0  
乳糖 17.0  
ポリビニルピロリドン 3.0

上記各材料を均一に混合し、常法により顆粒化し、約130 $\mu$ によって奏せられる効果は、次のとおりである。  
00mgずつゼラチン硬カプセル1000個に充填し、  
カプセル剤を調製した。なお、ラクトフェリン加水分解  
物以外の原料はいずれも市販品を用いた。

【0026】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明に☆

1) リンパ球の増殖を促進し、1g Gおよび1g Mクラ  
スの抗体の産生を増強することにより、疾病、老化等に  
よる免疫能の低下を予防または改善することができる。  
2) 乳等の天然物より調製したLF分解物を有効成分と  
しているため、極めて安全性が高い。

フロントページの続き

(72)発明者 宮内 浩文  
神奈川県横浜市旭区南希望が丘118 森永  
希望が丘寮

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-179355

(43)Date of publication of application : 18.07.1995

(51)Int.Cl.

A61K 38/00  
A61K 39/00  
// C07K 14/79

(21)Application number : 05-322089

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(22)Date of filing : 21.12.1993

(72)Inventor : SHIMAMURA SEIICHI  
FUKUWATARI YASUO  
KAINO AKIRA  
MIYAUCHI HIROFUMI

(54) IMMUNOPOTENTIATOR FOR PROMOTING ANTIBODY PRODUCTION OF IGG AND IGM CLASS

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an immunopotensiator having extremely high safety capable of preventing and improving reduction in immunocompetence caused by disease, aging, etc., by promoting proliferation of lymphocyte and enhancing antibody production of IgG and IgM classes.

CONSTITUTION: This immunopotentiator for promoting antibody production of IgG and IgM class comprises a hydrolyzate obtained by hydrolyzing a lactoferrin selected from the group consisting of a mammalian lactoferrin, a mammalian apolactoferrin, a mammalian lactoferrin saturated with a metal and their arbitrary mixtures.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.12.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3207647

[Date of registration] 06.07.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**This Page Blank (uspto)**